



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06300761 A**(43) Date of publication of application: **28.10.94**

(51) Int. Cl.

G01N 33/536
G01N 33/531(21) Application number: **05116319**(71) Applicant: **EIKEN CHEM CO LTD**(22) Date of filing: **19.04.93**(72) Inventor: **KIMURA AKIRA****(54) REAGENT AND METHOD FOR
IMMUNONEPHELOMETRY**

(57) Abstract:

PURPOSE: To accurately measure an insoluble immune complex generated through an antigen-antibody reaction by suppressing the nonspecific reaction with the use of a reagent containing a quaternary ammonium salt.

CONSTITUTION: One or more kinds of quaternary ammonium salt among choline chloride, choline bromide, choline iodine, choline bitartrate, acetylcholine chloride, betaine hydrochloride, etc., are selected. A using reagent contains the selected quaternary

ammonium salt. An insoluble immune complex generated in an antigen-antibody reaction is optically measured with the use of this reagent without using an insoluble carrier such as latex or the like. The using amount of the quaternary ammonium salt is adjusted to keep 0.1-10.0%, preferably, 0.3-3.0%. If the quaternary ammonium salt is used smaller than 0.1%, the nonspecific reaction cannot be sufficiently restricted. If the quaternary ammonium salt is used not smaller than 10.0%, it hinders the generation of the insoluble immune complex required for the measurement.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-300761

(43)公開日 平成6年(1994)10月28日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/536	F	8310-2 J		
33/531	B	8310-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数14 F D (全 11 頁)

(21)出願番号	特願平5-116319	(71)出願人	000120456 栄研化学株式会社 東京都文京区本郷1丁目33番8号
(22)出願日	平成5年(1993)4月19日	(72)発明者	木村 明 栃木県下都賀郡野木町野木143 栄研化学 株式会社生物化学研究所内

(54)【発明の名称】 免疫比濁測定試薬及び測定方法

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 本発明は、ラテックス等の不溶性担体を用いることなく、抗原抗体反応で生ずる不溶性の免疫複合体を光学的に測定することにより、生体試料中の免疫学的活性物質を測定する方法に用いる試薬において、非特異反応を抑制し、測定対象を精度良く、かつ正確に測定する免疫比濁測定試薬及び測定方法を提供することを目的とする。

【効果】 本発明は、試薬中に第4級アンモニウム塩を含有する免疫比濁測定試薬であるので、測定対象でない試料中の干渉物質との非特異反応が抑制され、測定対象の正確な測定が可能となり、正確度、信頼性、精度の向上した免疫比濁測定試薬の供給が可能となる。

【整理番号】 P 2 7 6

【特許請求の範囲】

【請求項1】 不溶性担体を用いることなく、抗原抗体反応で生ずる不溶性の免疫複合体を光学的に測定することにより、生体試料中の免疫学的活性物質を測定する方法に用いる試薬において、試薬中に第4級アンモニウム塩を含有することを特徴とする免疫比濁測定試薬。

【請求項2】 第4級アンモニウム塩が、塩化コリン、臭化コリン、ヨウ化コリン、重酒石酸コリン、塩化アセチルコリン、塩酸ベタインよりなる群より選ばれた1種又は2種以上の混合物として試薬中に含まれることを特徴とする請求項1記載の免疫比濁測定試薬。

【請求項3】 第4級アンモニウム塩を反応の場に0.1～10.0重量/容量%の濃度で存在するように試薬中に含むことを特徴とする請求項1及び請求項2記載の免疫比濁測定試薬。

【請求項4】 (1) 第4級アンモニウム塩とともに、(2) ポリエチレングリコール、ポリエチレンーポリプロピレンーブロック共重合体、ポリアニオンよりなる群より選ばれた1種又は2種以上の物質とを、試薬中に含有することを特徴とする請求項1～請求項3記載の免疫比濁測定試薬。

【請求項5】 ポリエチレングリコールを反応の場に1～15重量/容量%の濃度で存在するように試薬中に含むことを特徴とする請求項4記載の免疫比濁測定試薬。

【請求項6】 ポリエチレンーポリプロピレンーブロック共重合体を反応の場に1～15重量/容量%の濃度で存在するように試薬中に含むことを特徴とする請求項4記載の免疫比濁測定試薬。

【請求項7】 ポリアニオンを反応の場に0.001～1.000重量/容量%の濃度で存在するように試薬中に含むことを特徴とする請求項4記載の免疫比濁測定試薬。

【請求項8】 (1) 第4級アンモニウム塩と、(2) ポリエチレングリコール、ポリエチレンーポリプロピレンーブロック共重合体、ポリアニオンよりなる群より選ばれた1種又は2種以上の物質と、(3) 非イオン系界面活性剤とを、試薬中に含有することを特徴とする請求項1～請求項3記載の免疫比濁測定試薬。

【請求項9】 非イオン系界面活性剤を反応の場に0.01～5.00重量/容量%の濃度で存在するように試薬中に含むことを特徴とする請求項8記載の免疫比濁測定試薬。

【請求項10】 第4級アンモニウム塩及びポリエチレングリコールとともに非イオン系界面活性剤を反応の場に0.01～5.00重量/容量%の濃度で存在するように試薬中に含むことを特徴とする請求項9記載の免疫比濁測定試薬。

【請求項11】 第4級アンモニウム塩及びポリエチレンーポリプロピレンーブロック共重合体とともに非イオ

ン系界面活性剤を反応の場に0.01～5.00重量/容量%の濃度で存在するように試薬中に含むことを特徴とする請求項9記載の免疫比濁測定試薬。

【請求項12】 第4級アンモニウム塩及びポリアニオンとともに非イオン系界面活性剤を反応の場に0.01～5.00重量/容量%の濃度で存在するように試薬中に含むことを特徴とする請求項9記載の免疫比濁測定試薬。

【請求項13】 不溶性担体を用いることなく、抗原抗体反応で生ずる不溶性の免疫複合体を光学的に測定することにより、生体試料中の免疫学的活性物質を測定する方法において、反応の場に第4級アンモニウム塩を存在させることを特徴とする免疫比濁測定方法。

【請求項14】 不溶性担体を用いることなく、抗原抗体反応で生ずる不溶性の免疫複合体を光学的に測定することにより、生体試料中の免疫学的活性物質を測定する方法において、反応の場に第4級アンモニウム塩を存在させることにより、目的とする抗原抗体反応以外の非特異反応を抑制する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、抗原抗体反応を利用した免疫学的活性物質の測定に用いる免疫比濁測定試薬及び測定方法に関する。より詳しくは不溶性担体を用いない免疫比濁測定方法において、目的とする抗原抗体反応以外の非特異反応を抑制する試薬組成及び方法に関する。

【0002】

【従来の技術】抗原抗体反応を利用して、生体試料中の免疫活性物質を測定する免疫学的測定方法は臨床検査の分野で広く用いられている。例えば一元免疫拡散法(SRID)、免疫比濁法(TIA)、免疫比ろう法、赤血球凝集法(HA)、ラテックス凝集法(LA)、酵素免疫測定法(EIA)、放射免疫測定法(RIA)等が挙げられ、それぞれの操作性、感度、精度等から使用目的により使い分けられている。

【0003】その中でも、抗原抗体反応で生ずる不溶性の免疫複合体を光学的に測定する免疫比濁法(以下TIAと略す)は、酵素免疫測定法等で必要な洗浄操作(B/F分離工程)が不要で自動化が容易なことから、注目されつつある分析方法の1つである。又TIAは免疫成分を標識する必要が無いので、試薬の調製においても他の免疫分析法に比べ有利であり、広く用いられている。

【0004】例えば血清試料中の免疫グロブリン(Ig)G、A、M、トランスフェリン、補体、アポリポ蛋白、 β -リポ蛋白、Lp(a)、C反応性蛋白(CRP)、抗ストレプトリジンO(ASO)、リウマチ因子(RF)、プラスミノーゲン、アルブミン等の測定に利用されている。

【0005】その原理は試料中の抗原/抗体が試薬中の

抗体／抗原と反応する抗原抗体反応の結果、抗原抗体複合体からなる不溶性の反応生成物（懸濁粒子）が定量的に生じ、この懸濁粒子が光の透過を妨げること（散乱させること）を利用して光学的に定量する分析法である。

【0006】従って感度や精度、分析所用時間は懸濁粒子の形成程度に大きく左右される。一般的に抗原溶液とその抗原に特異的な抗体を混合した場合、10⁻³秒オーダーで抗原抗体反応が起こる。しかしその後、光学的に測定可能な大きさの懸濁粒子が形成されるまでには数分から数時間、或は数日間を要する場合もある。

【0007】そこで、懸濁粒子の形成を促進し、測定の迅速化、高感度化、高精度化を目的として、その反応を補助するために種々の添加物を用いる方法が研究されている。例えば、クリニカル ケミストリー（CLINICAL CHEMISTRY）20巻、1071頁（1974年）にはポリエチレングリコール（PEG）の使用が、特公昭60-4938号にはPEGと非イオン性界面活性剤の共存下で免疫反応を行う方法が記載されている。

【0008】特開平2-103466号には、一般式 $R_1O-[(CH_2CH_2O)_m(AO)_n]-R_2$ で表される化合物を用いることが記載されている。

【0009】更に特開昭61-25062号には、コンドロイチン硫酸、ヘパリン、デキストランなどのポリアニオンを用いることが記載されている。

【0010】しかし、これらの公知の添加物の使用では非特異反応の抑制が完全ではないため、必ずしも満足する結果が得られていない。例えば溶液中で抗原と抗体を反応させ、生じた免疫複合体を比濁法、吸光度法などの光学的な方法で測定する際に、目的とする抗原と抗体の反応に起因する凝集生成物以外に、試料中に存在する測定対象でない他の物質（いわゆる干渉物質）と試薬との非特異反応で濁りが生ずる。又PEG等の添加物自身が夾雑蛋白などと反応して濁りの原因となることも知られており、このような反応も非特異反応と呼ばれている。更に生体試料そのものの濁り（特に脂質）も誤差の原因となっている。

【0011】この対策として、特開昭64-15656号では試薬中に界面活性剤を添加することで非特異反応を抑制している。しかし界面活性剤単独では反応促進剤として用いられるPEG等の添加物質の影響を受け易く、補体の影響やその他の原因不明な濁りについての対策は不十分である。

【0012】このように誤差の原因となる濁りを生じる非特異反応の抑制、回避は従来の技術では満足な結果は得られていなかった。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記のような従来技術の問題点を解消し、非特異反応を抑制し、測定対象を精度良く、かつ正確に測定する免疫比濁測定試薬及び測定方法を提供することを目的とする。

【0014】

【課題を解決するための手段】本発明は、ラテックス等の不溶性担体を用いることなく、抗原抗体反応で生ずる不溶性の免疫複合体を光学的に測定することにより、生体試料中の免疫学的活性物質を測定する方法に用いる試薬において、試薬中に第4級アンモニウム塩を含有することを特徴とする免疫比濁測定試薬並びに測定方法である。

【0015】本発明で用いる第4級アンモニウム塩としては、塩化コリン、臭化コリン、ヨウ化コリン、重酒石酸コリン、塩化アセチルコリン、塩酸ベタイン等が挙げられる。これらの第4級アンモニウム塩は単独で使用しても、2種以上の混合物として使用しても構わない。

【0016】本発明で用いる第4級アンモニウム塩の使用量は、反応時の最終濃度が0.1～10.0%、好ましくは0.3～3.0%となるように添加量を調節する。（%は特に規定しない限り重量／容量%をあらわす）。

【0017】本発明で用いる第4級アンモニウム塩の使用量が、0.1%未満では非特異反応を十分抑制できず、又10.0%を越えた場合は測定に必要な不溶性の免疫複合体の生成を阻害するため適当でない。

【0018】本発明において、第4級アンモニウム塩は反応の場に必要量存在するようにすれば良いので、抗血清含有試薬や希釈液等の試料処理液に第4級アンモニウム塩を添加しておくこともできる。

【0019】更に、反応系には、必要に応じて、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンブロック共重合体（以下ブロック共重合体と略す）、ポリアニオンよりなる群より選ばれた1種又は2種以上の慣用の添加剤を加えてもよい。又これらと非イオン性界面活性剤とを組み合わせ用いてもよい。

【0020】本発明で用いるPEGは市販のPEGが使用でき、平均分子量が400～50万程度、好ましくは1500～10万の物が適しており、使用量は反応の場において濃度が1～15%となるように添加量を調節する。

【0021】本発明で用いるブロック共重合体としては、市販品ではプルロニックL34、プルロニックL44、プルロニックF68、プルロニックF88、プルロニックF108（いずれもワイアンドット・ケミカルズ製、商品名）、プロノン105やプロノン208（いずれも日本油脂製、商品名）、エマルゲンPP250、エマルゲンPP290（いずれも花王製、商品名）等があげられ、その使用量は反応の場において濃度が1～15%となるように添加量を調節する。

【0022】本発明で用いるポリアニオンとしてはデキストラン硫酸、リンタンゲステン酸、リンモリブデン酸等があげられ、使用量は反応の場において濃度が0.0

0.01~1.000%となるように添加量を調節する。

【0023】これらの慣用の添加剤は単独で用いてもよいし、複数を混ぜ合わせて使用してもよい。又、更に、以下に述べるように非イオン系界面活性剤と組み合わせて用いてもよい。

【0024】本発明で用いる非イオン系界面活性剤としては、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル等があり、これらはトリトン、ツイーン、ブリッジ等の名称で市販されている。この中でも水溶性のよい非イオン系界面活性剤が本発明には適している。使用量は反応の場において濃度が0.01~5.00%となるように添加量を調節し、PEG等の添加剤と組み合わせて使用する。

【0025】本発明の免疫比濁測定試薬において、その他の成分としては従来公知のものを利用すればよい。例えば緩衝剤としてはpHが中性付近のリン酸緩衝液やHEPES等のグッドの緩衝液が利用可能であり、更に必要に応じて試薬中にアジ化ナトリウムやパラベン等の防腐剤、安定化剤を添加して構わない。

【0026】

検体：ヒト血清

試薬1：20 mM リン酸緩衝液 pH 7.0

0.9% NaCl

4.5% ポリエチレングリコール6,000

0.5% 塩化コリン

検体量：20 μ l

試薬1添加量：320 μ l

【0030】検体20 μ lに試薬1を320 μ lを加え、37℃で5分間温置し、温置時間中の波長340nmにおける吸光度を測定した。同様に第4級アンモニウム塩が無添加の場合について測定を行い、両者を比較し※非特異反応の検討

*【作用】本発明の詳細な作用機序は不明であるが、次のように推測される。第4級アンモニウム塩は、水素結合やイオン結合による分子の会合体の形成を阻害する作用があることが知られている。又、抗原抗体反応も水素結合などによる分子会合体形成反応の1種であり、第4級アンモニウム塩により阻害を受ける。しかし適切な濃度範囲を選ぶことにより、本発明の第4級アンモニウム塩は目的とする免疫反応には影響を与えず、非特異反応のみを特異的に抑制するものと考えられる。

【0027】

【実施例】以下実施例に基づき本発明を詳細に説明するが、本発明はこの実施例に限定されるものではない。なお、本実施例で使用した試薬類は、特に規定したもの以外は、和光純薬(株)、東京化成(株)等より購入した市販品を使用した。

【0028】実施例1

第4級アンモニウム塩の添加による非特異反応の抑制効果を検討した。以下に示す分析条件により非特異反応による吸光度変化を測定した。

【0029】

*【化1】

※た。又、塩化コリンをヨウ化コリンに替えて同様に実施した。結果を表1、図1に示す。

【0031】

【表1】

(単位：OD)

反応時間(SEC)	無添加	塩化コリン	ヨウ化コリン
0	0.0340	0.0348	0.0329
30	0.0345	0.0345	0.0327
60	0.0357	0.0343	0.0327
90	0.0367	0.0344	0.0325
120	0.0378	0.0342	0.0324
150	0.0389	0.0342	0.0326
180	0.0398	0.0342	0.0324
210	0.0407	0.0342	0.0325
240	0.0415	0.0341	0.0325
270	0.0418	0.0341	0.0324
300	0.0424	0.0340	0.0325

【0032】表1及び図1に示されるように無添加では非特異反応による吸光度の上昇が認められたが、第4級アンモニウム塩を添加することにより吸光度の上昇は見

られず、非特異反応は抑制された。

【0033】実施例2

50 非特異反応の影響を受けないといわれているSRID法

(第一化学薬品(株)製)を対照に用いてアポリボ蛋白Bの測定を行い、第4級アンモニウム塩による非特異反応の抑制効果を調べた。以下に示す分析条件にて免疫比濁法によるアポリボ蛋白Bの測定を行った。標準にはア*

*ポリボ蛋白Bの濃度既知のヒト血清を用いた。

【0034】

【化2】

検体：ヒト血清

試薬1：50 mM HEPES緩衝液 pH7.0

0.9% NaCl

3.5% ポリエチレングリコール6,000

0.5% 塩化コリン

試薬2：50 mM HEPES緩衝液 pH7.0

0.9% NaCl

10% 抗ヒトアポリボ蛋白B血清

※ HEPES : N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid

検体量：5 μ l

試薬1添加量：320 μ l

試薬2添加量：80 μ l

【0035】アポリボ蛋白B含有ヒト血清5 μ l (検体)に320 μ lの試薬1を添加・混和し、37℃で5分間温置した。次いで試薬2を80 μ l加え、添加後5分間の主波長340 nm及び副波長700 nmの2波長における吸光度変化量を測定した。測定は日立7150形自動分析機を用いた。抗ヒトアポリボ蛋白B血清は、※

※常法によりアポリボ蛋白Bをヤギに免疫し得られたものを用いた。同時に第4級アンモニウム塩が無添加の場合について測定を行い、両者を比較した。結果を表2に示す。

【0036】

【表2】

SRID法との比較(アポリボ蛋白B)

(単位：mg/dl)

血清番号	SRID	無添加		塩化コリン	
	測定値	測定値	SRIDとの差	測定値	SRIDとの差
1	100	115	+15	102	+2
2	83	100	+17	82	-1
3	94	96	+2	92	-2
4	73	90	+17	77	+4
5	145	190	+45	147	+2
6	97	108	+11	100	+3
7	108	151	+43	106	-2
8	158	188	+30	160	+2
9	60	65	+5	61	+1
10	123	146	+23	121	-2

【0037】表2に示されるように無添加では非特異反応により正誤差を受けるが、第4級アンモニウム塩を添加したものは非特異反応が抑制されているためSRID法との差がほとんど認められなかった。

【0038】実施例3

非特異反応の影響を受けないといわれているSRID法(第一化学薬品(株)製)を対照に用いてアポリボ蛋白C-IIIの測定を行い、第4級アンモニウム塩による非特異反応の抑制効果を調べた。以下に示す分析条件にて免疫比濁法によるアポリボ蛋白C-IIIの測定を行った。標準には濃度既知のヒト血清を用いた。

【0039】

【化2】

【0040】アポリボ蛋白C-III含有ヒト血清10 μ lに対し300 μ lの試薬1を添加・混和し、37℃で5分間温置した。次いで試薬2を100 μ l加え、添加後5分間の主波長340 nm及び副波長700 nmの2波長における吸光度変化量を測定した。測定は日立7150形自動分析機を用い、抗ヒトアポリボ蛋白C-III血清は、常法によりアポリボ蛋白C-IIIをヤギに免疫し得られたものを用いた。同時に第4級アンモニウム塩が無添加の場合について測定を行い、両者を比較した。結果を表3に示す。

【0041】

【表3】

SRID法との比較（アポリポ蛋白C-III）

（単位：mg/dl）

血清番号	SRID	無添加		ヨウ化コリン	
	測定値	測定値	SRIDとの差	測定値	SRIDとの差
11	8.9	10.5	+1.6	8.9	0.0
12	7.6	10.1	+1.5	7.8	+0.2
13	12.2	14.8	+2.6	11.9	-0.3
14	8.0	9.2	+1.2	8.2	+0.2
15	18.2	22.0	+3.8	17.9	-0.3
16	9.4	10.9	+1.5	9.2	-0.2
17	12.2	13.1	+0.9	11.9	-0.3
18	14.1	16.5	+2.4	14.3	+0.2
19	5.5	6.4	+0.9	5.6	+0.1
20	7.6	8.1	+0.5	7.5	-0.1

【0042】表3に示されるように無添加では非特異反応により正誤差を受けるが、第4級アンモニウム塩を添加したものは非特異反応が抑制されているためSRID法との差がほとんど認められなかった。

【0043】実施例4
非特異反応の影響を受けないといわれているSRID法（日水製薬（株）製）を対照に用いてCRPの測定を行*

検体：ヒト血清

試薬1：50 mM MOPS緩衝液 pH7.2

0.9% NaCl

1.5% ポリエチレングリコール50.000

5.0% 塩化コリン

試薬2：50 mM MOPS緩衝液 pH7.5

0.9% NaCl

10% 抗ヒトCRP血清

※MOPS：3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid

検体量：20 μ l

試薬1添加量：320 μ l

試薬2添加量：80 μ l

【0045】CRP含有ヒト血清20 μ lに対し320 μ lの試薬1を添加・混和し、37℃で5分間温置した。次いで試薬2を80 μ l加え、添加後5分間の主波長340nm及び副波長700nmの2波長における吸光度変化量を測定した。測定は日立7150形自動分析機を用い、抗ヒトCRP血清は、常法によりCRPをや

*い、第4級アンモニウム塩による非特異反応の抑制効果を調べた。以下に示す分析条件にて免疫比濁法によるCRPの測定を行った。標準には濃度既知のヒト血清を用いた。

20 【0044】

【化4】

ぎに免疫し得られたものを用いた。同時に第4級アンモニウム塩が無添加の場合について測定を行い、両者を比較した。結果を表4に示す。

【0046】

【表4】

11
SRID法との比較 (CRP)

12
(単位: mg/dl)

血清番号	SRID	無添加		塩化コリン	
	測定値	測定値	SRIDとの差	測定値	SRIDとの差
21	0.41	0.90	+0.49	0.42	+0.01
22	0.35	0.42	+0.07	0.37	+0.02
23	0.38	0.45	+0.07	0.38	0.00
24	1.22	0.58	-0.64	1.21	-0.01
25	0.99	1.20	+0.21	1.00	+0.01
26	4.31	3.81	-0.50	4.31	0.00
27	0.54	0.33	-0.21	0.53	-0.01
28	2.01	1.55	-0.46	2.02	+0.01
29	0.75	0.80	+0.05	0.75	0.00
30	0.46	-0.10	-0.56	0.47	+0.01

【0047】表4に示されるように無添加では非特異反応により正又は負誤差を受けるが、第4級アンモニウム塩を添加したものは非特異反応が抑制されているためSRID法との差がほとんど認められなかった。

*24) について吸光度の経時変化を調べた。結果を表5及び図2に示す。

【0049】

【表5】

【0048】次に無添加で負誤差を受けた検体 (No. *20

第4級アンモニウム塩の添加と無添加の反応曲線の比較 (CRP)

(単位: OD)

反応時間 (SEC)	無添加	塩化コリン	ヨウ化コリン
0	0.1820	0.1201	0.1189
60	0.1760	0.1203	0.1188
120	0.1787	0.1206	0.1188
180	0.1821	0.1208	0.1188
240	0.1855	0.1212	0.1188
300	0.1889	0.1214	0.1188
360	0.1942	0.1521	0.1421
420	0.1971	0.1680	0.1586
480	0.2003	0.1790	0.1695
540	0.2035	0.1882	0.1777
600	0.2062	0.1923	0.1798

【0050】表5及び図2に示されるように、5分間の温置時間中に、抗体が含まれず本来なら血清と反応しない試薬1のみで吸光度のかなり大きな上昇が無添加では認められたが、塩化コリンを添加した試薬1では非特異反応による吸光度の上昇が認められなかった。同様にヨウ化コリンを添加した試薬1も測定したが、塩化コリンと同様に非特異反応による吸光度の上昇は認められなかった。

【0051】実施例5

測定精度の高いLATEX凝集法 (栄研化学 (株) 製) を対照に用いて抗streptozin O (ASO) 価の測定を行い、第4級アンモニウム塩添加試薬による測定値との比較を行った。以下に示す分析条件にて免疫比濁法によるASOの測定を行った。標準には濃度既知のヒト血清を用いた。

【0052】

【化5】

13

14

検体：ヒト血清

試薬1：50 mM TES緩衝液 pH 7.5
 0.9% NaCl
 0.2% デキストラン硫酸500,000
 5.0% 塩化コリン

試薬2：50 mM TES緩衝液 pH 7.5
 0.9% NaCl

3,000 IU/ml ストレプトリジンO (SLO)

*TES：N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-hydroxy-3-aminopropanesulfonic acid

検体量：20 μ l試薬1添加量：320 μ l試薬2添加量：80 μ l

【0053】ASO含有ヒト血清20 μ l に対し320 μ lの試薬1を添加・混和し、37℃で5分間温置した。次いで試薬2を80 μ l 加え、添加後5分間の主波長340 nm及び副波長700 nmの2波長における吸光度変化量を測定した。測定は日立7150形自動分析* LATEX法との比較 (ASO)

*機を用いた。同時に第4級アンモニウム塩が無添加の場合について測定を行い、両者を比較した。結果を表6に示す。

【0054】

【表6】

(単位：IU/ml)

血清番号	LATEX	無添加		塩化コリン	
	測定値	測定値	LATEXとの差	測定値	LATEXとの差
21	75	96	+21	76	+1
22	121	180	+59	123	+2
23	96	110	+14	96	0
24	144	60	-84	150	+6
25	71	80	+9	73	+2
26	11	15	+4	12	+1
27	23	30	+7	22	-1
28	43	80	+37	43	0
29	117	70	-47	118	+1
30	5	10	+5	5	0

【0055】表6に示されるように無添加では非特異反応により正又は負誤差を受けるが、第4級アンモニウム塩を添加したものは非特異反応が抑制されているためLATEX法との差はほとんど認められなかった。

【0056】次に、無添加で負誤差を受けた検体(N

o. 24) について吸光度の経時変化を調べた。結果を表7及び図3に示す。

【0057】

【表7】

15 16

第4級アンモニウム塩添加と無添加の反応曲線の比較 (ASO)

(単位: OD)

反応時間 (SEC)	無 添 加	塩 化 コ リ ン	ヨウ化コリン
0	0.0508	0.0302	0.0320
60	0.0624	0.0303	0.0319
120	0.0720	0.0303	0.0319
180	0.0790	0.0303	0.0318
240	0.0846	0.0303	0.0319
300	0.0896	0.0303	0.0319
360	0.0816	0.0626	0.0563
420	0.1352	0.0857	0.0771
480	0.1688	0.1005	0.0905
540	0.1868	0.1112	0.1001
600	0.2003	0.1192	0.1073

【0058】表7及び図3に示されるように、SLOが含まれず本来なら血清と反応しない試薬1で吸光度の上昇が認められたが、塩化コリンを添加した試薬1では非特異反応による吸光度の上昇が認められなかった。同様にヨウ化コリンを添加した試薬1も測定したが、塩化コリンと同様に非特異反応による吸光度の上昇は認められなかった。

【0059】実施例6

検体: ヒト血清

試薬1: 50 mM HEPES緩衝液 pH7.0
 0.9% NaCl
 3.5% ポリエチレングリコール6,000
 0.2% TRITON X-100
 1.5% 塩化コリン

試薬2: 50 mM HEPES緩衝液 pH7.0
 0.9% NaCl
 10% 抗ヒトLp(a)血清

※ HEPES: N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid

検体量: 15 μ l

試薬1添加量: 320 μ l

試薬2添加量: 80 μ l

【0061】Lp(a)含有ヒト血清15 μ lに対し320 μ lの試薬1を添加・混和し、37℃で5分間温置した。次いで試薬2を80 μ l加え、添加後5分間の主波長340nm及び副波長700nmの2波長における吸光度変化量を測定した。測定は日立7150形自動分

*測定精度の高いELISA法(バイオプール社(米国)製)を対照に用いてLp(a)の測定を行い、第4級アンモニウム塩と非イオン系界面活性剤を添加した試薬による測定値との比較を行った。以下に示す分析条件にて免疫比濁法によるLp(a)の測定を行った。標準には濃度既知のヒト血清を用いた。

【0060】

* 【化6】

析機を用い、抗ヒトLp(a)血清は、常法によりLp(a)をウサギに免疫し得られたものを用いた。結果を表8に示す。

【0062】

【表8】

17
ELISA法との比較 (L p (a))

18
(単位: mg/dl)

血清番号	ELISA	無添加		塩化コリン+界面活性剤	
	測定値	測定値	ELISAとの差	測定値	ELISAとの差
41	6.5	5.3	- 1.2	6.3	- 0.2
42	13.6	8.6	- 5.0	13.8	+ 0.2
43	9.0	7.1	- 1.9	9.1	+ 0.1
44	8.2	7.0	- 1.2	9.0	+ 0.8
45	9.9	6.1	- 3.8	10.4	+ 0.5
46	37.9	15.5	-22.4	39.8	+ 1.9
47	3.0	2.8	- 0.2	3.2	+ 0.2
48	9.4	6.8	- 2.6	9.6	+ 0.2
49	50.4	16.1	-34.3	52.3	+ 1.9
50	12.1	9.8	- 2.3	12.2	+ 0.1

【0063】表8に示されるように無添加では非特異反応により負誤差を受けるが、第4級アンモニウム塩と非イオン系界面活性剤を添加したものは非特異反応が抑制されているためELISA法との差がほとんど認められなかった。

*【0064】次に無添加で負誤差を受けた検体 (No. 49) について吸光度の経時変化を調べた。結果を表9及び図4に示す。

【0065】

*20 【表9】

第4級アンモニウム塩、界面活性剤の添加と無添加の反応曲線の比較 (L p (a))
(単位: OD)

反応時間 (SEC)	無添加	界面活性剤 添加	界面活性剤 +塩化コリン
0	0.1520	0.1210	0.1150
60	0.2031	0.1425	0.1149
120	0.2424	0.1639	0.1148
180	0.2728	0.1782	0.1148
240	0.2853	0.1852	0.1148
300	0.2944	0.1920	0.1148
360	0.1751	0.1377	0.1126
420	0.2633	0.1885	0.1542
480	0.3201	0.2211	0.1810
540	0.3524	0.2444	0.2012
600	0.3662	0.2619	0.2146

【0066】表9及び図4に示されるように、無添加では、抗体が含まれず本来なら血清と反応しない試薬1のみで吸光度の大きな上昇が認められ、又無添加に界面活性剤のみを加えた試薬1 (図4) でも吸光度のかかなりの上昇が認められた。しかし、第4級アンモニウム塩と非イオン系界面活性剤の両方を添加した試薬1では非特異反応による吸光度の上昇が認められなかった。非イオン系界面活性剤単独でもある程度非特異反応を抑制できるが第4級アンモニウム塩と組み合わせた試薬の方が抑制効果が優れており良好な結果が得られた。

【0067】

【発明の効果】試薬中の抗体/抗原と試料中の干渉物質との非特異反応により濁りが生じる。又、実施例1、4、5、6より試薬中に抗体/抗原がなくともポリエチ

レングリコール等の添加剤と試料中の干渉物質により非特異反応が起り、吸光度 (濁度) が増加する。第4級アンモニウム塩の添加によりこれらの非特異反応は抑制される。

【0068】本発明により、測定対象でない試料中の干渉物質との非特異反応が抑制されるので測定対象の正確な測定が可能となり、正確度、信頼性、精度の向上した免疫比濁測定試薬の供給が可能となる。

【0069】

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1の第4級アンモニウム塩による非特異反応の抑制効果を示す。

【図2】実施例4の第4級アンモニウム塩による非特異反応の抑制効果を示す。

【図3】実施例5の第4級アンモニウム塩による非特異反応の抑制効果を示す。

【図4】実施例6の第4級アンモニウム塩による非特異

検体：ヒト血清

試薬1：50 mM ACES緩衝液 pH7.0

0.9% NaCl

5.0% ブロニックF88

3.0% ヨウ化コリン

試薬2：50 mM ACES緩衝液 pH7.0

0.9% NaCl

10% 抗ヒトアポリボ蛋白C-III 血清

※ ACES : N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid

検体量 : 10 μ l

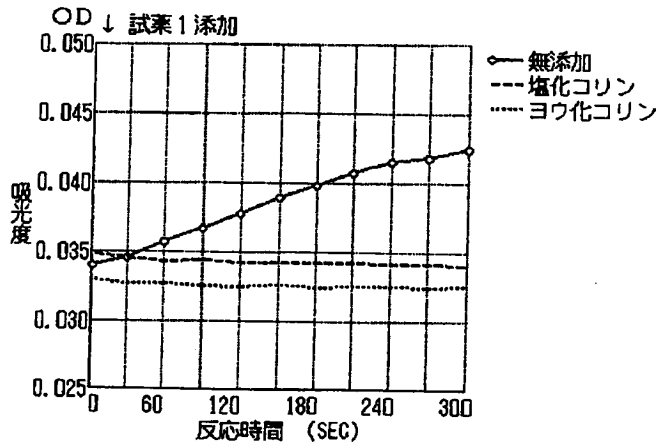
試薬1添加量 : 300 μ l

試薬2添加量 : 100 μ l

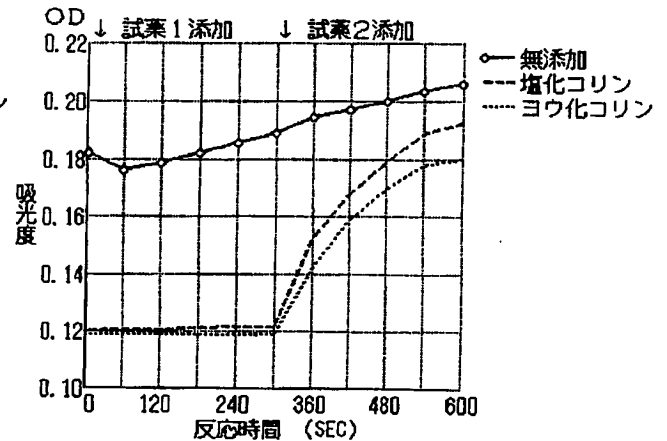
反応の抑制効果を示す。

【化3】

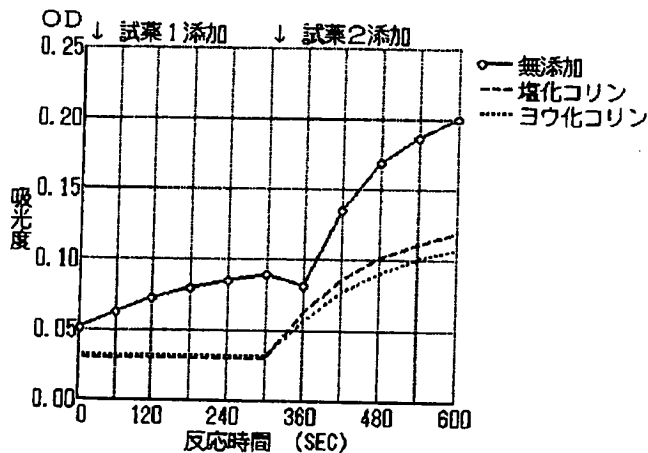
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

